

Über die enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von

OTTO FORSTER

aus Hugelshofen (Thurgau)

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. P. Karrer

Über die enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von

OTTO FORSTER

aus Hugelshofen (Thurgau)

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. P. Karrer

Meinem sehr verehrten Lehrer, *Herrn Prof. Dr. P. Karrer*, möchte ich an dieser Stelle für die große Unterstützung und Förderung, die ich durch ihn bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit erfahren durfte, meinen herzlichsten Dank aussprechen.



*Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet*

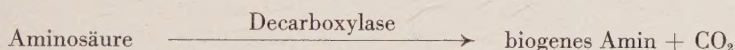


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507215_0007

Über die enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren

Die enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren ist ein in der Natur ablaufender Vorgang, bei welchem CO_2 aus Aminosäuren abgespalten wird, und die sog. «biogenen Amine» entstehen:



Die Bedeutung dieser Fermente geht schon aus der Bildung einiger biologisch äußerst wirksamer Stoffe hervor, die durch enzymatische Decarboxylierung aus den zugehörigen Aminosäuren gebildet werden. Hierzu gehören z. B. die Diamine Putrescin und Cadaverin, ferner das zu den Gewebshormonen gehörende Histamin, und das Tyramin.

Ueber die Eigenschaften dieser Enzyme sei vorweg gesagt, daß sich die prosthetische Gruppe bisweilen vom Proteinanteil, dem Apoferment, abtrennen läßt. Ueber die Struktur der Eiweiß-Komponenten ist bis heute noch nichts Genaueres bekannt.

Vorkommen der Aminosäure-Decarboxylasen

a) in Bakterien:

Die Aminosäure-Decarboxylasen lassen sich in einer großen Zahl verschiedener Bakterien nachweisen. So stellte *Gale*¹⁾ bei Arbeiten mit einer Auswahl verschiedener *Escherichia coli*-Stämmen fest, daß diese Mikroorganismen 1(+)-Arginin, 1(+)-Ornithin, 1(—)-Histamin, 1(+)-Lysin und 1(+)-Glutaminsäure zu decarboxylieren vermögen. Später erhielt *Epps*²⁾ durch Züchtung von *Streptococcus faecalis* ein Enzym, welches 1(—)-Tyrosin und 1-Dopa decarboxylierte; eine Eigenschaft, die auch *Clostridium aerofœtidum* besitzt.

Bei der enzymatischen Decarboxylierung von Aminosäuren ist zu unterscheiden, ob dieser Vorgang nur an wachsenden Bakterienkulturen während sehr langer Versuchszeit, oder an Präparaten von abgetöteten Zellen während kurzer Versuchsdauer beobachtet werden kann. Zu den erstgenannten Vorgängen gehört z. B. die Bildung von Tryptamin³⁾, Isoamylamin⁴⁾ und Colamin⁵⁾ aus den entsprechenden Aminosäuren in wachsenden Kulturen, während mit Suspensionen von abgetöteten Mikroorganismen bislang nur die Decarboxylierung der sieben Aminosäuren: 1(—)-Histidin, 1(+)-Glutaminsäure, 1(+)-Lysin, 1(—)-Tyrosin, 1(+)-Arginin, 1(+)-Ornithin und 1-Dopa beobachtet wurde. Alle anderen Aminosäuren blieben unter diesen Bedingungen unangegriffen.

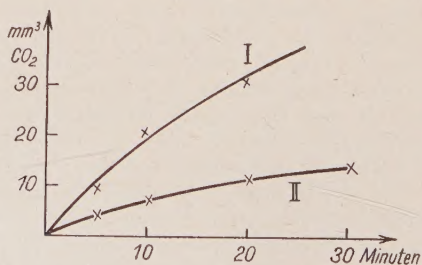
b) in Säugetierorganen:

Neben dem Decarboxylasegehalt dieser Mikroorganismen haben sich die Aminosäuredecarboxylasen auch in einigen Organen der verschiedensten Säugetiere nachweisen lassen. Am größten scheint bei allen Tieren der Decarboxylasegehalt der Nieren zu sein; daneben konnte das Enzym aber auch im Darm und in der Leber nachgewiesen werden⁶⁾. Mit Extrakten, die aus diesen Organen gewonnen wurden, gelang die Decarboxylierung von Tyrosin, Dopa und Histidin. Der Nachweis der gebildeten Amine gelang jedoch nur dann, wenn unter Ausschluß von Sauerstoff gearbeitet wurde, da unter aeroben Verhältnissen andere Enzyme eingreifen, welche die gebildeten Amine weiter abbauen. Diese Verhältnisse wurden zuerst von *Holtz*, welcher Nierenextrakte auf Dioxyphenylalanin einwirken ließ, genauer untersucht⁷⁾. Wurde hierbei unter Ausschluß von Sauerstoff gearbeitet, so ließ sich Oxytyramin nachweisen, während unter aeroben Bedingungen Dioxyphenylacetaldehyd gebildet wurde.

Die im Säugetierorganismus vorkommenden Decarboxylasen scheinen also nur ein Bestandteil eines Fermentsystems zu sein, welches aus den Decarboxylasen und den Aminoxydasen besteht, und als 1-Aminosäureoxydase bezeichnet wird. Die rasche Weiterverwandlung der Amine bei Anwesenheit von Sauerstoff erklärt auch die experimentellen Schwierigkeiten, die der Nachweis der Aminosäuredecarboxylasen in Säugetierorganen bereitet.

Der Dopadecarboxylasegehalt von Schweinenieren ließ sich bei Versuchen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ausgeführt wurden, gut nachweisen, sofern unter Stickstoff gearbeitet wurde; diese Experimente zeigten jedoch eine sehr rasche Abnahme der Fermentwirksamkeit. Obwohl die für die Versuche verwendeten Nieren stets bei tiefer Temperatur (-5° bis $+2^{\circ}$) aufbewahrt und extrahiert wurden, hatte sich die Decarboxylasewirksamkeit des Extraktes nach 20 Stunden um etwa 60—65 % vermindert:

Decarboxylierung von Dioxyphenylalanin mit einem wässrigen Extrakt aus Schweinenieren. (Extraktion mit Phosphat-Pufferlösung von p_H 6,35 bei 0° .) Kurve I zeigt die Decarboxylierungsgeschwindigkeit unmittelbar nach der Extraktion; Kurve II die Decarboxylierungsgeschwindigkeit nach 20stündigem Stehen der Fermentlösung bei 0° .



Diese Beobachtung läßt die Verwendung von Extrakten aus tierischen Organen wegen der schwierigen Reproduzierbarkeit der Resultate für quantitative Decarboxylierungsversuche wenig geeignet erscheinen.

c) in Pflanzen:

In neuerer Zeit ist es gelungen, in einer großen Zahl von Pflanzen Aminosäuredecarboxylasen nachzuweisen. Etwa 30 verschiedene Gemüsearten enthalten 1-Glutaminsäuredecarboxylase, worunter sich der Pfebenkürbis, der gemeine Pfeffer, sowie die Frucht des Avocadobaumes als besonders wirksam erwiesen haben⁸⁾.

Der Nachweis der Aminosäuredecarboxylasen ist auf verschiedenen Wegen möglich:

1. Die Tatsache, daß die durch Decarboxylierung gebildeten biogenen Amine z. T. stark gefäßkontrahierende, bzw. -dilatierende Wirkung haben, ermöglicht den Nachweis der Decarboxylasen durch Blutdruckmessungen. Auf diese Weise hat *Holtz* die Tyrosin-, Dopa- und Histidindecarboxylase nachweisen können^{7) 9)}.
2. Eine andere Möglichkeit, um den Ablauf der Decarboxylierung zu zeigen, besteht darin, Derivate des Amins, welches aus der zugesetzten Aminosäure entstanden ist, darzustellen. So konnte u. a. *Holtz*⁹⁾ die Decarboxylierung des Tyrosins durch Isolierung von Tyramin-dibenzoat beweisen, und *Gale*¹⁰⁾ identifizierte das aus Lysin entstandene Cadaverin als Pikrat.
3. Man läßt die Decarboxylierung in Warburg-Gefäßen ablaufen und bestimmt das dabei entstandene CO₂-Volumen volumetrisch. Zum Vergleich wird dabei in der Regel das pro Zeiteinheit und pro Milligramm Bakterientrockengewicht entstandene Volumen CO₂ in Kubikmillimeter angegeben.

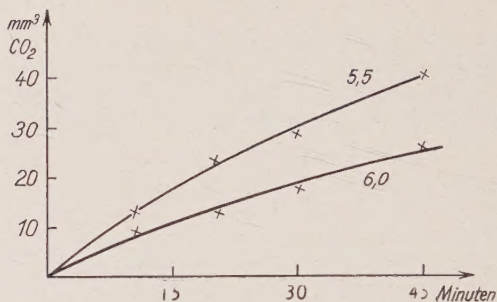
Wichtig für den Nachweis der Aminosäuredecarboxylasen ist, daß alle scharfe p_H-Aktivitätsmaxima aufweisen, welche für jedes der Enzyme einen bestimmten Wert haben, für alle aber im Bereich zwischen p_H 4 und p_H 6 liegen¹⁾.

Bedingungen für die optimale Bildung von Decarboxylasen in Mikroorganismen

Ob und in welchem Betrage bei der Züchtung von Mikroorganismen Aminosäuredecarboxylasen gebildet werden, hängt in starkem Maße von den Züchtungsbedingungen ab. Voraussetzung für die Fermentbildung ist saure Reaktion der Nährlösung während des Wachstums. Diese kann durch bakteriellen Abbau von Traubenzucker oder eines anderen leicht vergärbaren Kohlehydrates hervorgerufen werden¹⁾. Hierbei wurde festgestellt, daß der Decarboxylasegehalt der Mikroorganismen mit zunehmender Wasserstoffionen-Konzentration steigt. Allerdings nimmt das Bakterienwachstum mit zunehmender Acidität stark ab.

Eigene Versuche zeigten den Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration des Nährbodens auf den Tyrosin-Decarboxylasegehalt von *Strept. faecalis*:

Die Kurven zeigen den verschiedenen Fermentgehalt des Stammes *Strept. faecalis* R, American type culture collection Nr. 8043, einmal bei p_H 5,5, das andere Mal bei p_H 6 gezüchtet. Bei beiden Versuchen wurde das aus je 15 mg Acetontrockenpulver entwickelte CO₂-Volumen gemessen. Alle anderen Versuchsbedingungen, wie Nährboden, Temperatur und Wachstumsdauer waren beide Male genau gleich.



Ueber die Bedeutung, die dem p_H -Wert und dem Glucosegehalt der Nährlösung während des Wachstums zukommt, berichtet Gale¹⁾, daß die Bildung der Decarboxylasen in den Bakterien bei p_H 5 und Zugabe von Glucose stark gesteigert wird, während bei p_H 7 gezüchtete Bakterien nur einen geringen Decarboxylasegehalt zeigen. Beim *Escherichia coli* hingegen behindert der Kohlehydratzusatz die Bildung einer Ornithindecaboxylase, während auch von diesem Enzym bei sinkendem p_H — innerhalb physiologischer Grenzen — weit mehr gebildet wird.

Voraussetzung für die Bildung einer bestimmten Decarboxylase durch eine Bakterienart ist ferner, daß dem Nährboden die entsprechende Aminosäure zugesetzt wird; es handelt sich bei den Decarboxylasen also um adaptive Enzyme¹¹⁾. Eine Ausnahme bildet hier lediglich die Glutaminsäuredecaboxylase; aber auch hier wird die Fermentaktivität bei Zusatz von Glutaminsäure zum Nährboden gesteigert. — Auch die Züchtungstemperatur und das Alter der Kulturen sind für den Fermentgehalt der Mikroorganismen von Bedeutung¹¹⁾.

Gewinnung von zellfreien Fermentlösungen

Zur Gewinnung eines haltbaren Enzympräparates werden die abzentrifugierten Mikroorganismen in der Regel bei ca. -10° C mit Aceton behandelt, wodurch nach Trocknung ein helles Pulver erhalten wird, dessen Decarboxylaseaktivität bei Aufbewahrung im Vakuum meist mehrere Tage oder Wochen unverändert erhalten bleibt. Eine Ausnahme bildet hier die Ornithindecaboxylase aller Mikroorganismen und die Histidindecaboxylase von *Escherichia coli*, welche bei dieser Behandlung meist völlig zerstört werden.

Nach der Acetonbehandlung werden die trockenen Zellen in einem schwach alkalischen Medium autolysiert. Das Autolysat wird nach der Dialyse unmittelbar für die Decarboxylierungsversuche verwendet³⁸⁾. Zur weiteren Reinigung kann das Autolysat auch auf chromatographischem Wege zerlegt und nach Elution durch fraktionierte Fällung angereichert werden. Auf diese Weise gelang es z. B., die Lysindecaboxylase auf das 90fache, die Tyrosindecaboxylase auf das 116fache anzureichern¹²⁾. — Eine zellfreie Ornithindecaboxylase-Lösung konnte auf mechanischem Wege durch Schütteln von *Clostridium septicum* mit feinen Glasperlen erhalten werden¹³⁾. Die Reinigung, bzw. Anreicherung dieses

Enzyms durch Adsorption oder Umfällung gelang jedoch wegen der Labilität desselben bis heute nicht.

Die Spezifität der Aminosäuredecarboxylasen

Jede Decarboxylase ist spezifisch auf eine bestimmte Aminosäure eingestellt und vermag nur diese zu decarboxylieren. Dies erkannte zuerst *Holtz*, welcher Histidin, Dopa und Tyrosin mit Extrakten aus Kaninchen- und Meerschweinchen-nieren decarboxylierte. Die Tatsache, daß die bei der Decarboxylierung aus diesen Aminosäuren entstehenden biogenen Amine verschieden starke Blutdruckwirkung auf die Gefäße des Säugetierorganismus ausüben, ermöglicht den Beweis der Spezifität der Decarboxylasen^{9) 14)}.

Von 151 Colibakterien-Stämmen, welche *Gale* auf ihren Aminosäuredecarboxylase-Gehalt untersuchte, besaßen 114 Arginin-, 14 Histidin-, 142 Lysin-, 135 Ornithin-, 9 Tyrosin- und 130 Glutaminsäuredecarboxylase. Kein einziger Stamm besaß alle Fermente gleichzeitig; die Höchstzahl waren fünf Enzyme nebeneinander. Tyrosin- und Histidindecarboxylase werden in Bakterien nie gleichzeitig angetroffen; keines dieser Enzyme kommt in konstanter Vergesellschaftung mit einem anderen vor. In 500 Strept. faecalis-Stämmen wurde nur Tyrosindecarboxylase angetroffen¹¹⁾.

Bei dieser Gelegenheit soll noch ein eigener Versuch, dessen Ergebnis bezüglich der Spezifität der Aminosäuredecarboxylase interessant erscheint, erwähnt werden. Es wurde untersucht, ob die in Streptococcus faecalis Bakterien enthaltene Tyrosindecarboxylase auch O- oder N-Methyltyrosin zu decarboxylieren vermag. Beide Methylierungsprodukte wurden jedoch durch das Enzym nicht verändert. Dieser Befund deckt sich mit den Resultaten anderer Autoren, wonach 1(+)-Lysin, dessen ϵ -Aminogruppe, oder 1(-)-Tyrosin, dessen OH-Gruppe benzyliert oder methyliert ist, nicht angegriffen werden und die Decarboxylierbarkeit auch durch Substitution der NH_2 -Gruppe verschwindet. Bedenkt man, daß alle sieben decarboxylierbaren Aminosäuren außer der Carboxyl- und der Aminogruppe noch eine polare Gruppe besitzen, die sich stets an dem der Carboxylgruppe entgegengesetzten Ende des Moleküls befindet, so scheint die Decarboxylierbarkeit dieser Aminosäuren an die Voraussetzung geknüpft zu sein, daß diese drei polaren Gruppen nicht besetzt sind¹¹⁾.

Aus der Tatsache, daß die Lysindecarboxylase 1(-)-Ornithin nicht zu decarboxylieren vermag, und daß umgekehrt die Ornithindecarboxylase Lysin nicht angreift, erkennt man die strenge Spezifität der Decarboxylasen.

Die Spaltbarkeit der Aminosäuredecarboxylasen

Bei Versuchen *Gales*, auf chromatographischem Wege eine reine Lysin-decarboxylase aus Esch. coli und Bac. cadaveris abzutrennen, erhielt er eine Enzym-Fraktion, deren Wirksamkeit nur noch sehr gering war. Wie sich zeigen ließ, war dieser Aktivitätsverlust darauf zurückzuführen, daß das Coferment dieser Decarboxylase durch das Reinigungsverfahren abgetrennt worden war. *Gale* hatte das Enzymtrockenpulver durch Autolyse mit einer Borax-Pufferlösung autolysiert und das Autolysat durch Adsorption an Aluminiumoxyd frak-

tioniert. Nach Elution mit einer m/5 Phosphatlösung und Fällung mit Ammoniumsulfat wurde eine Fraktion erhalten, die nur noch Lysin zu decarboxylieren vermochte. Durch wiederholtes Umfällen der Eiweißbestandteile mit Ammoniumsulfat konnte eine Lösung erhalten werden, in der sich fast nur noch das Apoferment der Lysindecarboxylase befand, während das Coferment durch die häufige Umfällung weitgehend entfernt und die Wirksamkeit deshalb nur noch sehr gering war. Durch Zugabe eines Extraktes aus Brauereihefe konnte die Aktivität dieser Lysindecarboxylase jedoch wieder hergestellt werden¹⁰⁾.

In weiteren Versuchen zeigte *Epps* auch die Spaltbarkeit der in *Strept. faecalis* enthaltenen Tyrosin- und Dopadecarboxylase. Durch Behandlung dieser Mikroorganismen mit Aceton konnte ein sehr lange haltbares Präparat erhalten werden, welches nach Extraktion und Fraktionierung mit Ammoniumsulfat, wobei Abspaltung des Cofermentes eintritt, nur noch sehr geringe Aktivität zeigte. Wie bei der Lysindecarboxylase ließ sich die Wirksamkeit auch hier durch Zugabe des aus Brauereihefe gewonnenen Extraktes wiederherstellen²⁾.

Versuche zur Abtrennung des Cofermentes aus der Histidin- und Glutaminsäuredecarboxylase führten hingegen zunächst nicht zum Ziel^{15) 16)}. Für diese Experimente wurde der 1(—)Histidin- und 1(+)Glutaminsäuredecarboxylase enthaltende Mikroorganismus *Clost. welchii* verwendet. Durch Behandlung mit Aceton, wobei die Glutaminsäuredecarboxylase zerstört wird, erhielt man ein Trockenpulver, welches man der Autolyse unterwarf. Die im Autolysat enthaltene Histidindecarboxylase wurde durch Adsorption an Aluminiumoxyd und Elution mit Ammoniumsulfat-Lösung angereichert. Eine Verminderung der Aktivität, d. h. eine Abtrennung des Cofermentes ließ sich hierbei jedoch nicht erreichen. Auch wurde die Decarboxylierungsgeschwindigkeit durch Zusatz des Hefeextraktes nicht erhöht. Beim Vermischen des ganzen Enzyms mit Apofermenten anderer Decarboxylasen ergab sich auch keine Reaktivierung der letzteren. Aus diesen Resultaten mußte der Schluß gezogen werden, daß die Histidindecarboxylase von *Clost. welchii* keine Codecarboxylase enthält.

Zum gleichen Resultat gelangte man auch bei der Glutaminsäuredecarboxylase eines *Coli*-Stammes, die sich nach Autolyse mit Borax-Lösung weder durch 24stündige Dialyse gegen destilliertes Wasser, noch durch Dialyse gegen eine Ammoniumsulfat-Lösung spalten ließ¹³⁾.

Diese Resultate erschienen später, nachdem ein synthetisches Präparat, das Pyridoxal-phosphat, als Coferment einer Reihe von Decarboxylasen angesprochen worden war, unwahrscheinlich und wurden in der vorliegenden Arbeit nochmals einer näheren Prüfung unterzogen. Als Fermentquelle diente *Clost. welchii*. Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß neben der zur Autolyse verwendeten Lösung besonders auch das p_{H} , bei dem die Dialyse ausgeführt wird, für das Gelingen der Abspaltung des Cofermentes von ausschlaggebender Bedeutung ist. Bei geeigneten Versuchsbedingungen konnte nach Autolyse mit 0,15 m sec. Natriumphosphatlösung und Dialyse gegen eine Acetattpufferlösung von p_{H} 5,5 eine deutliche Verminderung der Fermentwirksamkeit erzielt werden. Hiernach ließ sich durch Zusatz von Pyridoxalphosphat als Coferment eine Erhöhung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit erreichen, womit bewiesen war, daß sich auch die Glutaminsäuredecarboxylase von *Clost. welchii* spalten läßt. —

Die auf gleichem Wege versuchte Spaltung der Histidindecaboxylase des Clostr. welchii gelang jedoch nicht.

Weiter gelang es Gale¹³⁾, die Spaltbarkeit der in Escherichia coli enthaltenen Arginindecaboxylase und der Ornithindecaboxylase aus Clostridium septicum zu zeigen. Auch bei diesen gespaltenen Enzymen konnte die Aktivität durch Zusatz des aus Hefe gewonnenen Cofermentes wieder hergestellt werden.

Die natürliche Codecarboxylase

Nachdem gezeigt worden war, daß sich die Apofermente der Lysin-, Tyrosin-, Arginin- und Ornithindecaboxylase durch Zusatz eines Hefe-Extraktes wieder reaktivieren lassen, versuchte man, sich über das Vorkommen dieser als Coferment der Aminosäuredecaboxylasen wirksamen Substanz in verschiedenen Stoffen zu orientieren. Hierzu wurden Bakterien — auch solche, in denen sich keine Aminosäuredecaboxylasen befinden —, Brauerei- und Bäckereihefe, Pflanzen, Milch, sämtliche Rattengewebe, sowie menschlicher Harn im Warburg-Apparat auf ihre Codecarboxylase-Wirksamkeit untersucht. Man fügte bestimmte Mengen Apoenzym von Tyrosin- und Lysindecaboxylase zu Extrakten, die aus den genannten Stoffen gewonnen worden waren, und verglich das entwickelte CO₂-Volumen mit dem aus den «Apoenzymen» allein entstandenen. Alle genannten untersuchten Stoffe, mit Ausnahme des menschlichen Harns, zeigten Cofermentgehalt¹⁷⁾. — Offenbar wird die Codecarboxylase im Urin in biologisch unwirksamer Form ausgeschieden¹⁸⁾.

In weiteren Versuchen gelang es nach einem komplizierten Verfahren, die Codecarboxylase aus Hefe auf das 15 000fache anzureichern und soweit zu reinigen, daß Angaben über die qualitative Zusammensetzung gemacht werden konnten. Nach den ersten mitgeteilten Analysen-Resultaten besteht das Coferment aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff¹⁷⁾ und wurde zunächst als frei von Phosphor beschrieben. Die Substanz erwies sich als stabil gegen Alkali, wurde aber von n/10 Säure bei 100° rasch zerstört. Später wurde allerdings in demselben, aus Hefe gewonnenen Präparat, ein Phosphorgehalt von ca. 1 % nachgewiesen¹⁹⁾.

Nachdem in den von Gale ausgeführten Versuchen die Spaltbarkeit einer Reihe von Aminosäuredecaboxylasen gezeigt worden war, legte die Stimulierung der Decarboxylierung verschiedener Aminosäuren durch Zusatz eines aus Hefe isolierten Stoffes den Schluß nahe, daß die Spezifität der Aminosäuredecaboxylasen ausschließlich auf der Apoferment-Komponente, also auf dem Proteinanteil, beruht.

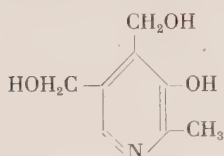
Um sich über die Natur der Codecarboxylase näheren Aufschluß zu verschaffen, wurde zunächst untersucht, ob dieser Stoff nicht mit einem bereits bekannten Coferment identisch sei. Versuche in dieser Richtung führten jedoch zu keinem Erfolg¹¹⁾.

Pyridoxal als Bestandteil der Codecarboxylase

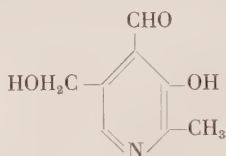
Bei der Züchtung von Strept. faecalis-Stämmen hatte Gale beobachtet, daß die Tyrosindecaboxylase-Aktivität dieser Bakterien stark von der Zusammen-

setzung der Nährlösung abhängt, und unter bestimmten Bedingungen sehr gering sein kann²⁰⁾. Bei späteren Untersuchungen in dieser Richtung stellten *Gun-salus* und *Bellamy* fest, daß die zur Vitamin B-Gruppe gehörenden Verbindungen für diese Verhältnisse verantwortlich sind. Ihre Versuche zeigten, daß einzelne Bestandteile der Nährlösung ohne nennenswerte Beeinträchtigung der Decarboxylase-Bildung weggelassen werden dürfen, während das Fehlen von Nicotinsäure und Pyridoxin einen starken Abfall der Ferment-Bildung zur Folge hat²¹⁾.

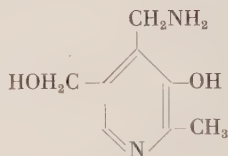
Näheren Aufschluß über die Natur der Codecarboxylase erhielt man, nachdem Untersuchungsergebnisse von *Snell* über das Pyridoxin und dessen Derivate Pyridoxal und Pyridoxamin bekannt geworden waren.



Pyridoxin



Pyridoxal



Pyridoxamin

Snell hatte gezeigt, daß Pyridoxal und Pyridoxamin auch als natürliche Wachstumsfaktoren für Mikroorganismen wirksam sind²²⁾. Er wies nach, daß Hefepilze und Ratten in ihrem Wachstum in gleichem Maße durch Pyridoxin, wie auch durch Pyridoxal und Pyridoxamin gefördert werden, während *Strept. faecalis* weit stärker auf Pyridoxal und Pyridoxamin als auf das Vitamin B₆ selbst anspricht. *Lactobacillus casei* dagegen wird in seinem Wachstum viel mehr von Pyridoxal als von Pyridoxamin und Pyridoxin beeinflusst. *Snell* bezeichnete die Aktivität der beiden Pyridoxinabkömmlinge als «Pseudopyridoxin-Aktivität».

Mikroorganismen

Hefepilze
Strept. faecalis
Lactobacillus casei

Wachstumsbeeinflussung

Pyridoxin = Pyridoxal = Pyridoxamin
Pyridoxamin > Pyridoxal ≫ Pyridoxin
Pyridoxal ≫ Pyridoxamin > Pyridoxin

Diese Verhältnisse ermöglichen die Unterscheidung dieser drei Verbindungen auf biologischem Wege. Die gesamte Vitamin B₆-Wirksamkeit (Pyridoxin- und «Pseudopyridoxin»-Wirksamkeit) kann mittels Hefepilzen bestimmt werden; mit Hilfe von *Strept. faecalis* läßt sich die «Pseudopyridoxin»-Wirksamkeit bestimmen, während die extrem starke Wachstumsbeeinflussung, die der *Lactobacillus casei* durch das Pyridoxal erfährt, auch noch die Differenzierung der «Pseudopyridoxin»-Wirksamkeit gestattet²⁷⁾.

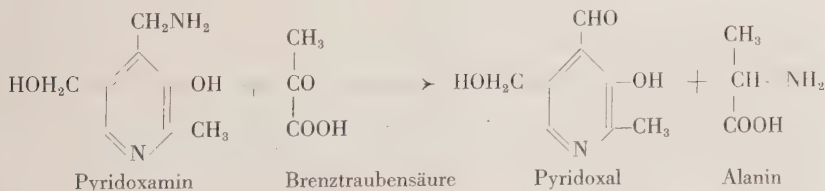
Mit Hilfe dieser Bestimmungsmethoden konnte *Snell* beweisen, daß Hefepilze und Säugetiere Pyridoxin in diese wirksamen Formen umzuwandeln vermögen²²⁾. Ueber die örtliche Verteilung der drei Verbindungen im Organismus wurde festgestellt: fast die gesamte VitaminB₆-Wirksamkeit in ruhenden Geweben, die der Speicherung oder der mechanischen Festigung dienen, beruht auf dem Vorhandensein von Pyridoxin, während Gewebe, welche unmittelbar am Lebensprozeß, d. h. am Stoffumsatz, beteiligt sind, verhältnismäßig mehr Pyridoxal und Pyridoxamin als Pyridoxin enthalten.

Snell deutete diese Beobachtung so, daß die im Lebensprozeß wirksame Form des Vitamin B₆ enzymartig sei und daß Pyridoxal und Pyridoxamin als Cofermente fungieren.

Gestützt auf diese Beobachtungen gelang es bald darauf, einen dieser Pyridoxinabkömmlinge als Hauptbestandteil der Aminosäure-codecarboxylase zu identifizieren. Zunächst hatten *Gunsalus* und Mitarbeiter bei der Tyrosin-Decarboxylierung mit *Strept. faecalis* eine Abhängigkeit der Decarboxylierungsgeschwindigkeit vom Pyridoxalgehalt der Bacillen-Nährlösung beobachtet²⁵). Wurden diese aber auf vollkommen Vitamin B₆-freiem Substrat gezüchtet, so besaßen sie nur ein geringes Tyrosin-Decarboxylierungsvermögen²⁶). Die Organismen haben das Enzym offenbar nicht mehr vollständig bilden können. Durch Zugabe von Pyridoxal zur Zellaufschlammung wurde die Wirksamkeit des Enzyms wieder regeneriert: Pyridoxaminzusatz hingegen war ohne Erfolg²³). Hieraus kann zunächst geschlossen werden, daß Pyridoxal mit dem Coferment in engstem Zusammenhang stehen muß.

Nun stellte *Gunsalus* aus Pyridoxin-frei gezüchteten *Strept. faecalis*-Bakterien ein trockenes Enzym-Präparat her, welches auf Tyrosin nur schwach decarboxylierend wirkte. Zugabe von Pyridoxal allein steigerte die Aktivität schwach. Wurde zu dieser Trockenpulver-Suspension aber Pyridoxal und Adenosintriphosphat gefügt, so konnte an der starken Decarboxylase-Wirkung die Regenerierung des Enzyms erkannt werden. Die schwache Steigerung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit durch Zugabe von Pyridoxal allein ist nach *Gunsalus* auf das Vorhandensein von Adenosintriphosphat in den Zellen zurückzuführen. Diese Resultate machten es wahrscheinlich, daß Pyridoxal bei Anwesenheit von Adenosintriphosphat in ein phosphorhaltiges Derivat übergeführt wird, welches als Coferment der Tyrosindecarboxylase wirksam ist. Ein Kontrollversuch, bei dem Pyridoxal und Muskeladenylsäure oder Adenosintriphosphat allein dem Apoferment zugesetzt wurden, zeigte keine größere Aktivierung des Fermentes als Pyridoxal allein. Somit sind also die Phosphorsäure und Pyridoxal für diesen Effekt verantwortlich zu machen²⁶).

Um festzustellen, ob außer Pyridoxal noch andere Glieder der B₆-Gruppe in Codecarboxylase verwandelt werden können, wurden verschiedene Organismen auf Nährböden, die entweder Pyridoxin, Pyridoxal oder Pyridoxamin enthielten, gezüchtet, gesammelt und auf ihren Codecarboxylasegehalt untersucht²¹). Hierbei zeigte sich, daß diese drei Verbindungen in wachsenden Organismen wenigstens teilweise in das Coferment verwandelt werden. Zudem verwandeln überlebende Zellen von *Strept. faecalis* Pyridoxamin in Codecarboxylase, wenn Brenztraubensäure anwesend ist. Legt man die Annahme zugrunde, daß diese Umwandlung über Pyridoxal verläuft, so läßt sich diese Reaktion als Transaminierung deuten, wobei Pyridoxal und Alanin entstehen²⁴):



Ferner wurde auch eine Beziehung zwischen dem Codecarboxylase-Gehalt von Rattengeweiben und dem Pyridoxin-Gehalt der Rattennahrung gefunden.

Strept. faecalis bildet mehr Codecarboxylase pro Mol Pyridoxal (oder anderer Glieder der B₆-Gruppe), wenn letzteres dem Nährboden, also den im Wachstum begriffenen Organismen, zugesetzt wird, als wenn die Zugabe erst zu überlebenden Zellen oder dem Enzympräparat erfolgt²⁴).

Synthetische Codecarboxylase

Die geschilderten Versuchsergebnisse machen es wahrscheinlich, daß die Codecarboxylase ein Phosphorylierungsprodukt des Pyridoxals ist. *Gunsalus* und Mitarbeiter nutzten diese Resultate aus, indem sie die Phosphorylierung des Pyridoxals *in vitro* versuchten. Dabei wurden die folgenden Methoden angewandt:

1. Behandlung des Pyridoxals mit Thionylchlorid und Substitution des eingeführten Chlors mit Silberdihydrogenphosphat²⁶).
2. Einwirkung von Phosphorsäure auf Pyridoxal in der Kälte²⁶).
3. Methode nach Schotten-Baumann³⁰).

Bei der letztgenannten Darstellungsmethode wurde das Reaktionsprodukt durch Adsorption an BaCl₂ angereichert. Ein definiertes Reaktionsprodukt wurde jedoch in keinem Fall erhalten; vielmehr handelte es sich wahrscheinlich um uneinheitliche Präparate, in denen sich gleichzeitig eine Reihe verschiedener Phosphorsäureester — worunter vielleicht auch Di-phosphorsäureester — befinden, da keine der funktionellen Gruppen des Pyridoxals vor der Phosphorylierung geschützt worden war. — Immerhin teilte *Gunsalus* mit, daß die so erhaltenen Reaktionsprodukte auch ohne Zusatz von Adenosintriphosphat Coferment-Wirksamkeit haben und daß die von *Gale* beschriebene natürliche Codecarboxylase bei der Tyrosin-Decarboxylierung durch diese ersetzt werden können^{25) 32}).

Ueber den Grad der Wirksamkeit dieser synthetischen Codecarboxylase, welche mit der eines Gemisches von Pyridoxal und ATP verglichen wurde, berichten *Gunsalus* und Mitarbeiter, daß Uebereinstimmung zwischen den in einer bestimmten Zeit entwickelten CO₂-Volumina festgestellt wurde, sofern das Apoferment aus einem Trockenpulver bestand, welches lediglich durch Vakuumtrocknung der *Strept. faecalis*-Bacillen erhalten wurde. Bediente man sich hingegen zur Bereitung der «Apoferment»-Lösung eines Aceton-Trockenpulvers dieser Mikroorganismen, so ergaben sich manchmal für die Wirksamkeit der synthetischen, wie auch bei der nach *Gale* isolierten natürlichen Codecarboxylase, weit höhere Werte als für den Pyridoxal + ATP-Standard. Diese Erscheinung beruht wahrscheinlich auf der Zerstörung des Enzyms, welches Pyridoxal mit Hilfe des ATP zum Coferment phosphoryliert, bei der Acetonbehandlung³⁰). Mit anderen Worten: Bei Verwendung von Aceton-Trockenpulver ist die bei Benutzung von Pyridoxal + ATP als Standard gemachte Voraussetzung, daß das Pyridoxal in hohem Maße zum Coferment phosphoryliert wird, nicht erfüllt. Aus diesem Grund wurde bei allen in dieser Arbeit ausgeführten Decarboxylierungsversuchen ein Trockenpulver verwendet, welches lediglich durch Trock-

nen der *Strept. faecalis*-Fällung bei niederer Temperatur im Hochvakuum bereitet worden war.

Die überraschende Angabe der amerikanischen Autoren, wonach die von ihnen synthetisierte «Codecarboxylase» etwa 18mal wirksamer als der Pyridoxal + ATP-Standard ist³¹⁾, ist um so merkwürdiger, als sich dies in späteren Mitteilungen nicht bestätigt findet.

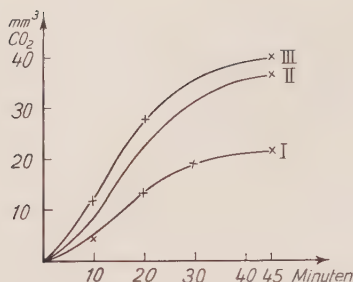
In weiteren Arbeiten gelang es in der Folge, die Wirksamkeit dieses Pyridoxal-Phosphorylierungsproduktes als Coenzym auch bei der Decarboxylierung von Glutaminsäure und Arginin mit den aus *Esch. coli* durch Autolyse und Dialyse erhaltenen Apofermenten zu zeigen³²⁾.

Der Wert dieser, mit dem synthetischen Coferment ausgeführten Versuche liegt nun vor allem darin, daß damit Pyridoxal und Phosphorsäure einwandfrei als die Bestandteile der Aminosäurecodecarboxylase sichergestellt wurden. Die sich schon aus den Versuchen *Gales* ergebende Vermutung, wonach die Spezifität der Aminosäuredecarboxylasen allein auf den Proteinanteil zurückzuführen ist und bei allen untersuchten Decarboxylasen das gleiche Coferment wirksam ist, hat dadurch noch mehr an Wahrscheinlichkeit gewonnen.

Da es sich bei dem von *Gunsalus* und Mitarbeitern dargestellten Produkt aber mit größter Wahrscheinlichkeit um ein Gemisch verschiedener Phosphorylierungsprodukte handelt, kann nicht gesagt werden, welche Komponente dieser Substanz biologisch wirksam ist. Um jedoch eine eindeutige Aussage über die Konstitution der Codecarboxylase machen zu können, müßte der von *Gunsalus* dargestellte, als Coferment wirksame Stoff noch weiter gereinigt werden, was bisher nicht gelungen ist. Das nach der Methode von Schotten-Baumann synthetisierte Gemisch enthält nach spektroskopischen Bestimmungen 6,2 % gebundenen Phosphor, etwa 50 % Barium und 32 % Pyridoxal³¹⁾.

Gestützt auf die wichtige Beobachtung, wonach die hier beschriebene «synthetische Codecarboxylase» keine Phenolreaktion bei Anwendung der Chlorimidreaktion zeigt³¹⁾, kann man folgern, daß die phenolische Hydroxylgruppe des Pyridoxals verestert ist. Es gelang *Karrer* und *Viscontini*, ein kristallisiertes Phosphorylierungsprodukt des Pyridoxals, das Pyridoxal-acetal-3-phosphat, darzustellen³⁴⁾. Diese Verbindung wurde als Coferment der Tyrosindecarboxylase beschrieben. Später zeigten *Karrer* und *Viscontini*, daß dieses Pyridoxal-phosphat auch die Decarboxylierung von Arginin, Lysin und Glutaminsäure stark stimuliert. Als Fermentquelle für diese Versuche dienten drei *Escherichia coli*-Stämme, von denen nach Autolyse das Coferment durch Dialyse teilweise entfernt worden war. Hiernach ließ sich die Wirksamkeit des Pyridoxal-acetal-phosphates mit diesen an Coferment verarmten Apofermenten deutlich zeigen³⁵⁾.

Bei der Decarboxylierung von Tyrosin mit *Strept. faecalis* wurde mit einem Trockenpulver gearbeitet, welches nach der Zentrifugation durch Trocknung der Fällung bei tiefer Temperatur erhalten worden war. Hier ließ sich die Wirksamkeit des Pyridoxal-acetal-phosphates direkt, d. h. ohne vorherige Dialyse, nachweisen. Die folgenden Kurven geben die bei diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse wieder. Es wurde jeweils mit der gleichen Menge Trockenpulver aus Pyridoxin-arm gezüchteten *Strept. faecalis* Bakterien, aber verschieden großen Coferment-Zusätzen gearbeitet:

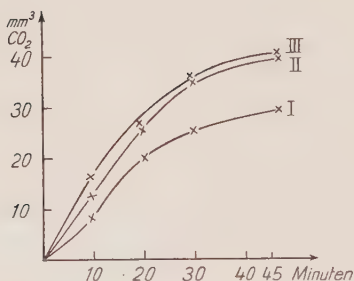


I 23 γ Pyridoxal-acetal und Kurve des Blindversuches (ohne Zusatz einer Pyridoxal-Verbindung).

II 23 γ Pyridoxal-acetal + 500 γ ATP.

III 29 γ Pyridoxal-acetal-phosphat.

Apoferment: 4 mg Trockenpulver von Strept. faecalis.

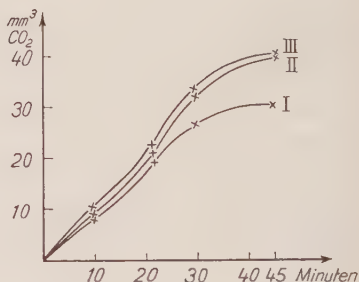


I 2,3 γ Pyridoxal-acetal und Blindversuch.

II 2,3 γ Pyridoxal-acetal + 500 γ ATP.

III 2,9 γ Pyridoxal-acetal-phosphat.

Apoferment: 4 mg Trockenpulver von Strept. faecalis.



I 0,46 γ Pyridoxal-acetal und Blindversuch.

II 0,46 γ Pyridoxal-acetal und 500 γ ATP.

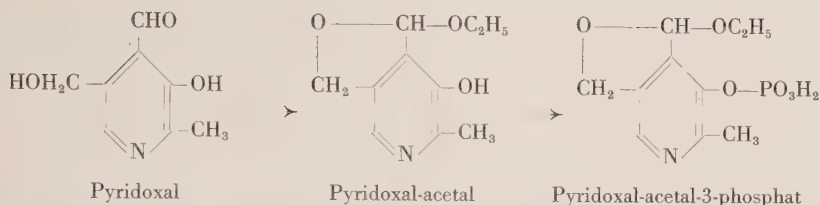
III 0,58 γ Pyridoxal-acetal-phosphat.

Apoferment: 4 mg Trockenpulver von Strept. faecalis.

Da die Decarboxylierungsgeschwindigkeit bei allen vier untersuchten Decarboxylasen durch Zusatz einer reinen Substanz als Coferment zu den verschiedenen Apofermenten erhöht wurde, ist der Beweis dafür erbracht, daß die Spezifität der genannten Aminosäuredecarboxylasen ausschließlich auf die Apofermentkomponente, d. h. auf den Protein-Anteil, zurückzuführen ist.

Die Konstitution der Codecarboxylase

Die Konstitution des von Karrer und Viscontini kristallisiert erhaltenen, biologisch wirksamen Pyridoxal-acetal-3-phosphates ist auf Grund der Darstellungsweise eindeutig klaggestellt:



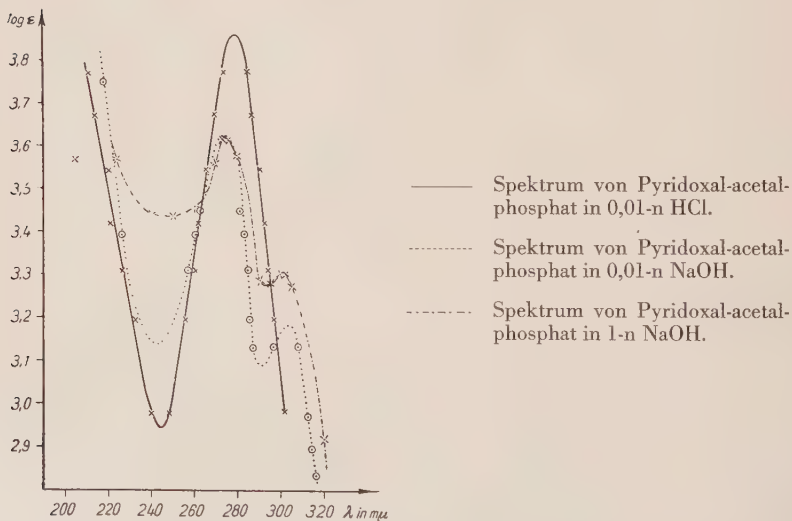
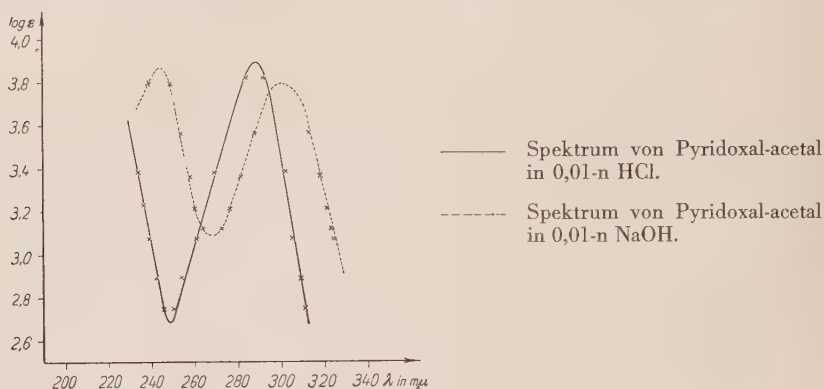
Betrachtet man hingegen die von *Gunsalus* und Mitarbeitern angewandte Methode zur Phosphorylierung des Pyridoxals, so kann — wie bereits erwähnt — vermutet werden, daß das erhaltene Produkt ein Gemisch verschiedener Ester darstellt. Welche der darin enthaltenen Komponenten biologisch aktiv ist, läßt sich nicht sagen. Ueber die Eigenschaften dieses wirksamen Phosphorylierungsproduktes teilen die Autoren folgendes mit:

1. Das Absorptionsspektrum der «synthetischen Codecarboxylase» unterscheidet sich in alkalischer Lösung von dem des Pyridoxals durch das Fehlen der Bande bei 3000 Å ³¹⁾.
2. Die «synthetische Codecarboxylase» gibt keine Phenolreaktion. Diese tritt aber bei der Behandlung mit 1-n HCl bei 100° — wobei der Phosphorsäurerest hydrolytisch abgespalten wird — in dem Maße wieder auf, in dem die biologische Aktivität verloren geht. Mit der zunehmenden Stärke der Phenolreaktion geht auch eine Vergrößerung der Bande bei 3000 Å einher (bei p_H 13) ³¹⁾:

Min.	Menge zerstörten Cofermentes	Menge des freigesetzten Phosphors	Phenolreaktion	Bande bei 3000 Å
0	0	0	0	0
30	49	42	42	43
90	79	78	81	81
180	99	99,7	100	100

Aus diesen Angaben kann mit großer Sicherheit entnommen werden, daß die phenolische Hydroxylgruppe des Pyridoxals verestert ist. Diese Schlußfolgerung wird jedoch von *Gunsalus* und Mitarbeitern verworfen ^{35) 36)}. Als Begründung führen die amerikanischen Autoren an, daß im Spektrum der Pyridoxal-3-phosphorsäure die Bande bei 3000 Å in alkalischer Lösung nicht verschwinden oder verschoben werden dürfte, da dies bei anderen Pyridoxinderivaten mit verschlossener Phenolgruppe auch nicht der Fall sei. Als Beispiel für ein Pyridoxinderivat mit verschlossener phenolischer Gruppe führen die Autoren den Pyridoxin-3-methyläther an ³⁷⁾. Diese Folgerung scheint aber nicht stichhaltig, da die phenolische Hydroxylgruppe im vorliegenden Fall (Pyridoxal-3-phosphorsäure) durch eine Gruppe verschlossen wird, welche selbst dissoziierbare H-Atome trägt. Also ist auch das Phosphorylierungsprodukt befähigt in alkalischer Lösung als Anion zu fungieren, was hingegen beim Pyridoxin-3-methyläther nicht der Fall ist. Es ist also vielmehr beim Pyridoxal als auch beim in Stellung 3 phosphorylierten Pyridoxal zu erwarten, daß sich eine Aenderung des p_H im Spektrum ausdrücken wird, denn beide Verbindungen liegen in saurer Lösung als Kation, in alkalischer als Anion vor. Die in der vorliegenden Arbeit aufgenom-

menen Spektren von Pyridoxal-acetal in 0,01-n HCl und 0,01-n NaOH, sowie von kristallisiertem Pyridoxal-acetal-phosphat in 0,01-n HCl, 0,01-n und 1-n NaOH bestätigen diese Erwartung:



Diese Kurven zeigen folgende Maxima in alkalischer, bzw. saurer Lösung:

Absorpt.-Maximum bei:

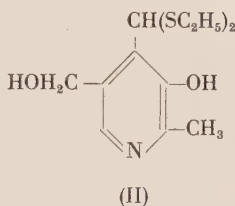
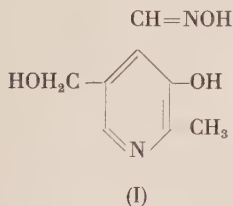
Pyridoxal-acetal in 0,01-n HCl	2880 Å
Pyridoxal-acetal in 0,01-n NaOH	3020 Å
Pyridoxal-acetal-phosphat in 0,01-n HCl	2800 Å
Pyridoxal-acetal-phosphat in 0,01-n NaOH	2740 und 3040 Å
Pyridoxal-acetal-phosphat in 1-n NaOH	2740 und 3020 Å

Die Annahme, daß sich die Spektren des Pyridoxal-3-phosphorsäureesters und des Pyridoxin-3-methyläthers gleich verhalten müssen, trifft also nicht zu.

Die Möglichkeit, daß sich der Phosphorsäurerest an der Acetalhydroxylgruppe der Acetalform des Pyridoxals befindet, ist nach *I. C. Gunsalus, W. W. Umbreit*³⁵⁾, sowie *D. Heyl, St. A. Harris* und *K. Folkers*³⁶⁾ ausgeschlossen, da diese Autoren ein Oxim des phosphorylierten Pyridoxals darstellen konnten. Dieses soll nur Spuren von Coferment-Aktivität gezeigt haben.

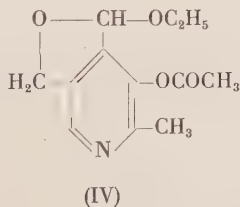
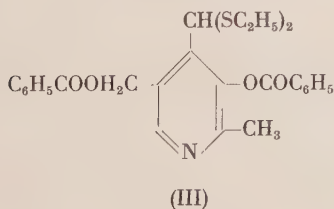
In diesem Zusammenhang wäre es von besonderem Interesse gewesen, das in Stellung 5 phosphorylierte Pyridoxal darzustellen. Ausgehend von verschiedenen Derivaten des Pyridoxals wurde in der vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung der primären Alkoholgruppe versucht.

Bei wiederholten Ansätzen zur Phosphorylierung des Pyridoxaloxims (I) in Pyridin mit Phosphoroxychlorid gelang es indessen nie, ein einheitliches Produkt zu gewinnen. Ebenfalls führten Versuche zur Tritylierung des Pyridoxaloxims oder des Pyridoxal-diäthylmercaptals (II) nicht zum Ziel.

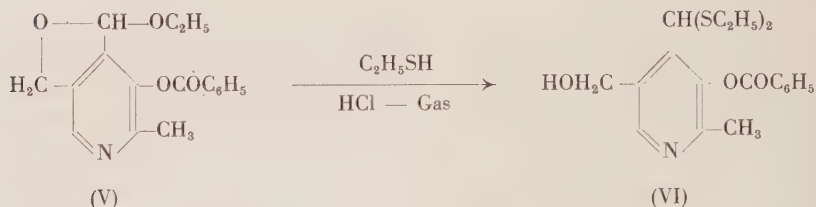


Beim Versuch, das Pyridoxal-diäthylmercaptal (II) zu phosphorylieren, konnte lediglich ein uneinheitliches, amorphes Reaktionsprodukt gewonnen werden, welches nur wenig Phosphor enthielt. Die Benzoylierung dieses Mercaptals zur Dibenzoyl-Verbindung (III) war hingegen ohne weiteres möglich. Beim Versuch, letztere partiell zum Monobenzoyl-pyridoxal-mercaptal zu verseifen, wurden jedoch beide Acylreste abgespalten.

Um nun auf anderem Weg ein Pyridoxal-derivat mit freier primärer Alkoholgruppe zu erhalten, wurde Pyridoxal-äthyl-acetal zum Pyridoxal-äthyl-acetalacetat (IV) acetyliert und versucht, die Acetalgruppe ohne Abspaltung der Acetylgruppe zu spalten. Bei der Anwendung milder Methoden blieb diese Verbindung jedoch unverändert; sobald jedoch die Abspaltung mit etwas energiereicheren Mitteln versucht wurde, trat nicht nur Verseifung der Acetalgruppe, sondern auch Abspaltung der Acetylgruppe ein.



Zum gleichen Resultat gelangte man bei der Wiederholung des Versuches mit Benzoyl-pyridoxal-äthyl-acetal (V); sobald die Bedingungen zur Verseifung der Acetalgruppe gegeben waren, wurde gleichzeitig auch die Benzoylgruppe abgespalten.



Schließlich gelang es auf anderem Weg ein Pyridoxal-derivat mit freier primärer Alkoholgruppe darzustellen. Durch Behandlung einer Lösung von Benzoyl-pyridoxal-äthylacetal in Aethylmercaptan mit Chlorwasserstoff-Gas läßt sich das Pyridoxal-diäthylmercaptal-3-benzoat (VI) gewinnen. Allerdings konnten wir die primäre Alkoholgruppe auch dieser Verbindung nicht phosphorylieren.

Wie diese Versuche zeigen, ist die Darstellung eines in der Stellung 5 phosphorylierten Pyridoxal-derivates, ausgehend von den genannten Verbindungen, unter den angewandten Bedingungen²⁹⁾ bisher nicht gelungen. Worauf die Reaktionsträgheit dieser primären Alkoholgruppe beruht, läßt sich nicht sagen. Jedenfalls kann wohl mit Sicherheit daraus geschlossen werden, daß die Phosphorylierung der primären Alkoholgruppe des Pyridoxals ungleich schwerer erfolgt, als die Phosphorylierung der phenolischen Hydroxylgruppe. Infolgedessen besteht wohl auch das von den amerikanischen Forschern beschriebene Pyridoxal-phosphorylierungsprodukt³¹⁾ zum größten Teil aus dem Pyridoxal-3-phosphat.

Literaturverzeichnis

- 1) *Gale*, Biochem. J. **34**, 392, 846; **35**, 64
- 2) *Epps*, Biochem. J. **38**, 242
- 3) *Berthelot und Bertrand*, Compt. rend. **154**, 1643, 1826
- 4) *Arai*, Biochem. Z. **122**, 251
- 5) *Nord*, Biochem. Z. **95**, 281
- 6) *Holtz*, Naturw. **25**, 457
Holtz, Janisch, Arch. f. exper. Path. **186**, 684
Holtz, Heise, Arch. f. exper. Path. **186**, 377
Holtz, Klin. Wschr. **16**, 1561
- 7) *Holtz, Reinhold, Credner*, Z. phys. Ch. **261**, 279
- 8) *Schales*, Federation B. **5**, 1
- 9) *Holtz*, Z. phys. Ch. **251**, 226
- 10) *Gale, Epps*, Biochem. J. **38**, 232
- 11) *Gale*, Advances in Enzymology **6**, 1
- 12) *Epps*, Biochem. J. **39**, 42
Gale, Epps, Biochem. J. **38**, 232, 242
- 13) *Taylor, Gale*, Biochem. J. **39**, 52
- 14) *Holtz, Credner, Walter*, Z. phys. Ch. **262**, 111
- 15) *Epps*, Biochem. J. **39**, 42
- 16) *Baddiley, Gale*, Nature **155**, 727
- 17) *Gale, Epps*, Biochem. J. **38**, 250
- 18) *Huff, Perlzweig*, J. of Biol. Chem. **155**, 345
Johnson, Hamilton, Mitchell, J. of Biol. Chem. **158**, 619
- 19) *Gale, Baddiley*, Nature **155**, 728
- 20) *Gale*, Biochem. J. **34**, 846
- 21) *Bellamy, Gunsalus*, J. Bact. **48**, 191
- 22) *Snell*, J. of Biol. Chem. **154**, 313
Snell, Am. soc. **66**, 2082
Snell, Rarrefeld, J. of Biol. Chem. **157**, 491
- 23) *Gunsalus, Bellamy*, J. of Biol. Chem. **155**, 357
- 24) *Bellamy, Umbreit, Gunsalus*, J. of Biol. Chem. **160**, 461
- 25) *Bellamy, Gunsalus*, J. Bact. **46**, 573
- 26) *Gunsalus, Bellamy, Umbreit*, J. of Biol. Chem. **155**, 685
- 27) *Snell*, J. of Biol. Chem. **157**, 491
- 28) *Snell*, Am. soc. **67**, 194
- 29) *Bellamy, Gunsalus*, J. Bact. **48**, 191
- 30) *Gunsalus*, Arch. Biochem. **7**, 185
- 31) *Gunsalus, Umbreit, Bellamy, Foust*, J. of Biol. Chem. **161**, 743
- 32) *Umbreit, Bellamy, Gunsalus*, J. of Biol. Chem. **159**, 333
- 33) *Gunsalus, Umbreit, Bellamy, Foust*, J. of Biol. Chem. **161**, 743
- 34) *Karrer, Viscontini*, Helv. **30**, 52
- 35) Abstracts Americ. Chem. Soc. 110th meeting, Chicago 34 B
- 36) Abstracts Americ. Chem. Soc. 110th meeting, Chicago 35 B
- 37) *Stiller, Keresztesy*, Am. soc. **61**, 1239
- 38) *Karrer, Viscontini*, Helv. **30**, 524
- 39) *Karrer, Viscontini, Forster*, Helv. **31**, 1004

Experimenteller Teil

Gewinnung einer wässrigen Dopa-Decarboxylase-haltigen Lösung aus Schweine-Niere

Drei Schweinenieren wurden in der Kälte durch Abziehen der äußeren Haut und mechanisches Entfernen des Fettes gereinigt. Das so erhaltene Gewebe hat man in gefrorenem Zustand im Eisschrank zweimal hintereinander durch die Fleischhackmaschine gedreht, den erhaltenen feinen Brei (250 g) sofort mit 250 cm³ einer eiskalten Phosphat-Pufferlösung vom p_H 7,35 übergossen und während 30 Minuten bei 0° extrahiert. Hiernach wurde sofort durch drei Schichten Gaze abgepreßt und das Filtrat in einer vorgekühlten Zentrifuge im Eisschrank während 15 Minuten zentrifugiert. Von der überstehenden roten, schwach opaleszierenden Lösung haben wir je 2 cm³ pro Warburg-Gefäß für die Decarboxylierungsversuche abpipettiert.

Bereitung der Pyridoxin-freien Casein-Traubenzucker-Nährlösung zur Züchtung der Bacillen für die Decarboxylierungsversuche

Reinigung des Caseins:

100 g Casein (Siegfried) wurden viermal mit je einem Liter dest. Wasser während 5 bis 10 Minuten ausgekocht und das gewaschene Casein jedesmal auf einer Filternutsche abgesaugt und ausgepreßt. Das so vorgereinigte Casein hat man in einem Liter Wasser, worin eine bekannte Menge Natriumhydroxyd (ca. 4 g) gelöst war, eingetragen und unter ständigem Rühren auf 60—65° erwärmt. Nach etwa 15 Minuten war das Casein in Lösung gegangen. — Die zum Lösen des Caseins benötigte Menge Natriumhydroxyd war bekannt; eine hierzu äquivalente Menge Salzsäure wurde in einem 4 Liter Stutzen mit dest. Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und unter ständigem Rühren die Caseinlösung langsam zu der verdünnten Salzsäure gefügt, wobei ein Niederschlag von reinweißem Casein entstand. Das ausgefällte Casein hat man an der Wasserstrahlpumpe auf einer Porzellannutsche abgesaugt und gut mit dest. Wasser gewaschen. Nach nochmaliger Umfällung mit NaOH und HCl wurde das Casein weiterverarbeitet.

Hydrolyse des Caseins:

100 g gereinigtes Casein wurden in ca. einem Liter 4 bis 5 n Salzsäure während 8 Stunden am Rückfluß gekocht, wobei eine dunkelbraune Lösung entstand. Nach dem Erkalten haben wir die saure Lösung durch ein Faltenfilter filtriert und das wässrige Filtrat im Vakuum bei 50° so weit eingengt, bis ein stark viscoser Sirup zurückblieb. Den Rückstand, der immer noch viel Salzsäure

enthält, haben wir zur Entfernung derselben mehrmals mit je 30 cm³ Wasser versetzt und dieses jeweils wieder abdestilliert. Schließlich wurden 500 cm³ dest. Wasser zugefügt, erwärmt, und hierauf langsam Bleioxyd eingetragen bis die Lösung nur noch schwach sauer reagierte (p_H 3 bis 4). Nach etwa 10stündigem Stehen in der Kälte hatte sich Bleichlorid ausgeschieden, welches man abfiltrierte. Zur Zersetzung der Bleisalze und Entfernung des überschüssigen Bleies wurde Schwefelwasserstoff-Gas in das Filtrat eingeleitet. Nach abermaliger Filtration hat man das Filtrat zur Entfernung des Schwefelwasserstoffes kurz aufgekocht. So erhielten wir 500 cm³ einer gelben wässrigen Lösung freier Aminosäuren.

Die Pyridoxin-arme Nährlösung, in welcher die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen gezüchtet wurden, setzte sich aus folgenden Stoffen zusammen:

In die 500 cm³ Aminosäurelösung, deren Herstellung durch Hydrolyse von 100 g Casein vorher beschrieben wurde, löste man folgende reine Verbindungen auf:

50 g sec. Kaliumphosphat	10 mg Vitamin B ₂
20 g Natriumacetat	10 mg Vitamin B ₁
2 g l(+) Alanin	10 mg Pantothen säure
2 g Cystein	25 γ Folsäure
1 g Tryptophan	10 γ Biotin
500 mg Thioglycolsäure	2 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O
250 mg Adenin	100 mg FeSO ₄
50 mg Guanin	10 mg MnSO ₄
50 mg Uracil	
50 mg Nicotinsäure	

Die Lösung wurde hernach mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und genau neutralisiert (p_H = 7).

Nach der Sterilisation dieser Lösung hat man 50 g ebenfalls sterilisierten Traubenzucker hinzugefügt.

Vor der Impfung wird diese Stammlösung im Verhältnis 1 : 10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Versuch zur Phosphorylierung des Pyridoxal-oxims

200 mg Pyridoxal-oxim wurden gut getrocknet und hierauf in 4 cm³ abs. Pyridin gelöst. Nach Eintropfen von 1,5 Mol, in 1,5 cm³ abs. Pyridin gelöstem, frisch destilliertem Phosphoroxychlorid bei 0° blieb das Reaktionsgemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, und wurde hierauf noch 2 Std. im Wasserbad auf 50° erwärmt. Schon kurz nach dem Eintragen der POCl₃-Lösung hatte sich am Boden des Gefäßes eine dunkelbraune, Pyridin-unlösliche Masse abgeschieden.

Hierauf haben wir das Reaktionsgemisch auf 0° gekühlt und in ca. 10 cm³ Eiswasser gegossen, wobei bis auf einen ganz geringen Rückstand, welchen man abfiltrierte, alles in Lösung ging. In die wässrige Lösung wurde bei 0° bis zur neutralen Reaktion fein pulverisiertes Bariumhydroxyd eingetragen, von abgeschiedenem Ba-phosphat abzentrifugiert, bis p_H 9 weiteres Bariumhydroxyd zugegeben und die Lösung nochmals durch Zentrifugation geklärt. Hierauf haben

wir die überstehende Flüssigkeit abdekantiert und das im Ueberschuß vorhandene Barium durch Einleiten von Kohlensäure-Gas und kurzes Erwärmen der Lösung als Bariumcarbonat abgetrennt.

Die so erhaltene, hellgelbe Lösung wurde im Vakuum bei 40° vollkommen zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit ca. 5 cm³ H₂O behandelt, wobei eine schwach getrübbte Lösung entstand. (Wahrscheinlich handelte es sich dabei um Spuren von Ausgangsmaterial oder Bariumcarbonat.) Diese Trübung wurde durch Filtration entfernt, die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand bei ca. 60° im Vakuum während einer halben Stunde getrocknet. Hierauf haben wir den Rückstand mit abs. Alkohol behandelt, die dabei entstehende hellgelbe Lösung vom fast farblosen Bodenkörper abpipettiert und filtriert, den Bodenkörper nochmals mit wenig abs. Alkohol gewaschen und die vereinigten alkoholischen Extrakte im Vakuum zur Trockne verdampft.

Der Alkohol-unlösliche, farblose Rückstand war frei von Stickstoff und bestand zum größten Teil aus Barium-carbonat, welches beim Einleiten der Kohlensäure als Bariumbicarbonat in Lösung geblieben war. Der durch Verdampfen des Alkohols erhaltene Rückstand enthielt neben Spuren von Bariumcarbonat auch Stickstoff und Phosphor. Er wurde in wenig abs. Alkohol aufgenommen und die Lösung bis zur Trübung tropfenweise mit trockenem Aether versetzt. Die Trübung schied sich schnell als dunkelbraune Masse, die zum größten Teil aus Phosphorsäure bestand, ab. — Die überstehende, milchige Lösung haben wir abdekantiert und weiter durch Zusatz von Aether fraktioniert gefällt. Hierbei wurden verschiedene Fraktionen erhalten, von denen die erste 0,9 % Phosphor enthielt, während nachher eine bei 206° schmelzende Fraktion erhalten wurde, welche einen N-Gehalt von 12,57 % (Pyridoxal-oxim 15,3 % N₂, Schmelzpunkt 225°) zeigte, aber Phosphor-frei war.

Versuch zur Tritylierung des Pyridoxal-oxims

Triphenylchlormethan wurde vor der Verarbeitung durch zweimaliges Umkristallisieren aus 5 Teilen Petroläther und 1 Teil Acetylchlorid gereinigt. Hiernach lag der Schmelzpunkt bei 109° (Lit.: 112°).

100 mg trockenes Pyridoxal-oxim wurden in 1,3 cm³ abs. Pyridin gelöst und 170 mg Triphenylchlormethan hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch blieb über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, worauf man es noch 2 Stunden auf 50—60° erwärmte.

Zur Aufarbeitung wurde das Pyridin im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit gesättigter, wässriger Bicarbonat-Lösung versetzt, um alles Chlorhydrat in die freie Base überzuführen. Es entstand eine Suspension, von der ein Teil durch Zugabe von Aether in Lösung gebracht werden konnte. Daneben war noch ein Wasser- und Aether-unlöslicher Teil vorhanden, welchen man abfiltrierte, mit wenig kaltem Wasser wusch und trocknete. 65 mg. — Der Schmelzpunkt dieser Substanz lag bei 205°; sie enthielt Stickstoff. Wahrscheinlich handelt es sich um nicht umgesetztes Pyridoxal-oxim.

Das aus wässriger und ätherischer Lösung bestehende Filtrat wurde im Scheidetrichter getrennt, die Aetherlösung mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Verdampfen des Aethers und Trocknen im

Vakuum blieb eine Stickstoff-freie, bei 148° schmelzende Substanz zurück. Nach dem Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther war ihr Schmelzpunkt auf 156° gestiegen. Diese Eigenschaften, sowie die Löslichkeit der Substanz zeigten, daß es sich um Triphenylcarbinol handelt. — Die wässrige Lösung wurde im Vakuum zur Trockne verdampft und mit Aether ausgezogen. Es blieb ein geringer Rückstand (15 mg) zurück, welcher Stickstoff enthielt und nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte.

Darstellung von Pyridoxal-diäthylmercaptal

• 100 mg Pyridoxal-oxim wurden nach *Harris, Heyl* und *Folkers* mit NaNO_2 in salzsaurer Lösung in das Hydrochlorid des Pyridoxals übergeführt. — Das so erhaltene Gemisch von Pyridoxal-hydrochlorid und NaCl wurde in 0,3 cm³ konz. HCl gelöst. Zu dieser Lösung haben wir ca. 90 mg Aethylmercaptop in drei Portionen einpipettiert, wobei man den Kolben nach jeder Zugabe verschloß, und kräftig schüttelte. Nach beendeter Zugabe blieb das Reaktionsgemisch verschlossen über Nacht stehen.

Zur Isolierung des Mercaptals wurde zunächst die Salzsäure im Vakuum bei einer Badtemperatur von 30° abdestilliert, wobei die Vorlage mit KOH beschickt war. Es blieb ein gelb-brauner Rückstand, das rohe Hydrochlorid des Mercaptals, zurück. Um daraus die Base in Freiheit zu setzen, wurde er in 4 bis 5 cm³ Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, wobei die Base ausfiel. Nach dem Abnutschen und Waschen mit wenig kaltem Wasser haben wir den Rückstand in 10 cm³ kochendem Wasser gelöst und zur Kristallisation gestellt.

Das auskristallisierte Pyridoxal-diäthylmercaptal wurde während zwei Stunden bei 70° im Hochvakuum getrocknet. Der Schmelzpunkt der Kristalle lag bei 126°; die Analyse ergab folgende Resultate:

Berechnet:	52,33 % C	6,65 % H
Gefunden:	52,74 % C	6,96 % H

Ausbeute: 56 mg Pyridoxal-diäthylmercaptal aus 100 mg Pyridoxal-oxim. Die Mercaptal-Gruppe ist gegenüber Säuren sehr beständig; in schwach alkalischer Lösung tritt aber schon bei Zimmertemperatur rasch Spaltung ein.

Versuch zur Phosphorylierung des Pyridoxal-diäthylmercaptals

350 mg Pyridoxal-diäthylmercaptal wurden in 2,5 cm³ trockenem Pyridin gelöst und auf 0° abgekühlt. Andererseits löste man 850 mg frisch destilliertes Phosphoroxychlorid in 2,5 cm³ Pyridin und kühlte diese Flüssigkeit ebenfalls. Nun wurde die POCl_3 -Lösung innerhalb von 10 Minuten in die Pyridoxal-mercaptal-Lösung getropft. Das zunächst gold-gelbe Reaktionsgemisch hatte sich nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur gelb-braun gefärbt.

Zur Aufarbeitung wurde das Pyridin durch Vakuumdestillation größtenteils entfernt; es blieb eine braune Masse zurück. Diese hat man auf 0° abgekühlt und dazu langsam Eiswasser getropft, wobei bis auf einen geringen Teil (ca. 20 mg,

die durch Filtration entfernt wurden) alles in Lösung ging. In die klare Lösung trugen wir so lange feinst gepulvertes Barium-methylat ein, bis das p_H der Lösung 6,5—7 betrug. Beim Stehen über Nacht hatte sich Ba-phosphat abgeschieden; es wurde auf einer Glasfilternutsche abgesaugt und das Filtrat weiter bis p_H 8,5 mit Barium-methylat versetzt. Nach Entfernung einer weiteren, geringen Ba-phosphat-Menge hat man die wässrige Lösung so lange mit 0,2 n H_2SO_4 tropfenweise versetzt, bis sie neutral reagierte und das ausgeschiedene $BaSO_4$ durch Absaugen entfernt.

Nachdem die freie Phosphorsäure so aus der Lösung abgetrennt war, wurde letztere im Vakuum bei 35° zur Trockne verdampft und der Rückstand getrocknet. Durch Behandlung mit abs. Alkohol bei 40° ließ sich ein farbloser, aus $BaCl_2$ bestehender Rückstand abscheiden.

Diese alkoholische Lösung wurde zur Trockne verdampft; es blieb ein brauner Rückstand zurück, der neben Stickstoff und Phosphor noch geringe Mengen Chlor enthielt. Zur Entfernung des Halogens haben wir die Substanz in 5 cm³ H_2O gelöst, Silbercarbonat im Ueberschuß dazugegeben, und 6 Stunden geschüttelt. Nach Entfernung des Bodenkörpers wurde durch Einleiten von H_2S wenig gelöstes Silber abgetrennt, das Filtrat zur Trockne verdampft und der im Hochvakuum getrocknete Rückstand analysiert:

Gefunden: N 6,01%; P 5,46%; S 11,45%

Die dunkelbraune, amorphe Substanz konnte nicht kristallisiert werden. Falls nicht ein Gemisch verschiedener Stoffe vorliegt, könnte es sich, wie das Verhältnis von S : P = 2 : 1 und der hohe Stickstoffwert erkennen lassen, vielleicht um unreines, mono-phosphoryliertes Pyridin-Salz des Pyridoxal-mercaptals handeln.

Bei einem Versuch zur Tritylierung des Pyridoxal-mercaptals konnte kein Tritylierungsprodukt, sondern nur Pyridoxal-mercaptopal und Triphenylcarbinol zurückerhalten werden.

Darstellung von Dibenzoyl-pyridoxal-diäthylmercaptopal

170 mg Pyridoxal-diäthylmercaptopal wurden in 5 cm³ abs. Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung haben wir unter Eiskühlung 360 mg Benzoylchlorid, in 3 cm³ Pyridin gelöst, eingetropft. Zur Aufarbeitung hat man das Reaktionsgemisch auf 0° abgekühlt und tropfenweise vorsichtig mit ca. 5 cm³ Eiswasser versetzt. Durch Eintragen von Natriumhydrogencarbonat wurde die Lösung schwach alkalisch gemacht und dreimal mit Aether ausgezogen. Die vereinigten, mit Wasser gewaschenen Aetherextrakte haben wir über Natriumsulfat getrocknet und hierauf den Aether verdampft. Der Rückstand enthielt noch Spuren Pyridin, die sich durch 2stündiges Erwärmen bei 35° im Hochvakuum entfernen ließen. Der getrocknete, gelbbraune Rückstand wurde in 3 bis 4 cm³ Alkohol in der Wärme gelöst, die Lösung filtriert und zur Kristallisation gestellt. Nach dreimaligem Umkristallisieren lag der Schmelzpunkt des Dibenzoyl-pyridoxal-diäthylmercaptals bei 93°. Ausbeute 250 mg. Die Analyse ergab folgende Werte:

$C_{26}H_{27}O_4NS_2$ (481,2)	Berechnet:	C 64,83 %	H 5,65 %
	Gefunden:	C 65,03 %	H 5,62 %

Acetyl-pyridoxal-äthylacetal

1 g Pyridoxal-äthylacetal wurde in 7 cm³ abs. Pyridin gelöst und auf 0° abgekühlt. Hierauf hat man eine Lösung von 900 mg Essigsäureanhydrid in 4 cm³ Pyridin tropfenweise unter Schütteln des Kolbens zu der gekühlten Lösung gefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht stehen gelassen. Zur Aufarbeitung haben wir ca. $\frac{2}{3}$ des Pyridins bei 50° Badtemperatur im Vakuum entfernt und den Rückstand auf—5° abgekühlt, worauf wir allmählich 1 cm³ H₂O eintropften. Nach einigem Stehen haben wir diese wässrige Pyridinlösung in einem Scheidetrichter mit weiteren 15 cm³ Wasser versetzt, bis zur deutlichen alkalischen Reaktion Natriumhydrogencarbonat zugefügt und viermal mit je 15 cm³ Aether ausgezogen. Die vereinigten, mit Wasser gewaschenen Aetherauszüge haben wir getrocknet, filtriert, den Aether abdestilliert und so ein gelbes Oel erhalten, welches man zweimal im Kugelrohr bei 0,005 mm Druck destillierte. Es ging bei 125—127° über. Wie die Analyse zeigt, handelt es sich um das Acetyl-pyridoxal-äthylacetal:

C ₁₂ H ₁₅ O ₄ N	Berechnet:	C 60,73 %	H 6,37 %	N 5,90 %
(237,1)	Gefunden:	C 59,84 %	H 6,14 %	N 5,89 %

Das viskose Oel konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden.

Benzoyl-pyridoxal-äthylacetal

270 mg Pyridoxal-äthylacetal-hydrochlorid wurden in 2 cm³ abs. Pyridin gelöst und die Lösung auf 0° abgekühlt. Nach Eintropfen eines Gemisches von 0,15 cm³ Benzoylchlorid und 2,5 cm³ Pyridin haben wir das Gemisch nach 8stündigem Stehen und kurzem Erwärmen auf 50° im Wasserbad vorsichtig in 8 cm³ Eiswasser getropft, wobei eine milchige Suspension entstand. Durch Eintragen von Natriumhydrogencarbonat wurde alkalisch gemacht und 4mal mit Aether ausgezogen. Die vereinigten, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschenen und getrockneten Aetherauszüge haben wir eingengt und das zurückbleibende Oel während zwei Stunden bei 65° im Hochvakuum getrocknet. Es gelang nicht, das farblose, stark viskose Oel zur Kristallisation zu bringen, weshalb es zur weiteren Reinigung mit viel Petroläther ausgekocht, filtriert und die gelöste Substanz nach Entfernung des Lösungsmittels durch Analyse auf ihre Reinheit geprüft wurde.

C ₁₇ H ₁₇ O ₄ N	Berechnet:	C 68,20 %	H 5,72 %	N 4,7 %
(299,1)	Gefunden:	C 68,45 %	H 6,09 %	N 5,2 %

Das benzoylierte Pyridoxal-acetal ist in Alkohol und Aether leicht löslich, schwer löslich in Petroläther und unlöslich in Wasser.

Versuche zur Aufspaltung der Acetal-Gruppe beim Acetyl-pyridoxal-acetal

395 mg Acetyl-pyridoxal-acetal wurden mit der berechneten Menge 1-n Salzsäure in das Hydrochlorid übergeführt und zu dieser wässrigen Lösung 1 Tropfen 6-n Salzsäure gefügt. Nachdem diese Lösung während 5 Minuten im Wasser-

bad auf 50—55° erwärmt worden war und hiernach $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur gestanden hatte, haben wir sie mit Natriumhydrogencarbonat alkalisch gemacht (p_{H} 8) und 5mal mit je 10 cm³ Aether ausgezogen. Nach dem Trocknen und Verdampfen des Aethers blieben 380 mg eines gelben Oels zurück, dessen Aethoxy-Gehalt 18,40 % betrug. (Der Aethoxy-Gehalt des Ausgangsmaterials beträgt 18,93 %).

Die Acetalgruppe war unter den geschilderten Bedingungen also nicht gespalten worden.

Die zurückerhaltene Substanz wurde nochmals mit der berechneten Menge Salzsäure in Wasser gelöst und 8 Tropfen 6-n Salzsäure zugefügt. Nach 10 Minuten Erwärmen auf 60—65° und halbstündigem Stehen wurde, wie oben geschildert, alkalisch ausgeäthert. Die so zurückgewonnene Substanz zeigte unveränderten Aethoxy-Gehalt.

Bei einem weiteren Versuch zur Spaltung der Acetalgruppe derselben Substanz haben wir nach der Salzsäurebehandlung nicht wie vorher ausgeäthert, sondern die salzsaure, wässrige Lösung im Vakuum bei 30—35° zur Trockne eingengt. Nach Umkristallisieren aus Wasser, Aceton und wenig Aether lag der Schmelzpunkt der Substanz bei 166°. Die Kristalle, deren Stickstoff-Gehalt 7,11 % betrug, enthielten kein—OC₂H₅ mehr. Es handelte sich um Pyridoxalhydrochlorid, dessen N-Gehalt 6,90 % beträgt und welches bei 171° schmilzt.

Die gleichen Versuche wurden mit Benzoyl-pyridoxal-acetal wiederholt. Auch hier ließ sich bei der gleichen Behandlung mit verdünnter Salzsäure keine Spaltung der Acetalgruppe erreichen, während beim Eindampfen der wässrigen Lösung im Vakuum bei 30—35° neben der Spaltung des Acetals auch der Benzoyl-Rest abgespalten wurde, so daß sich auch hier nur freies Pyridoxal zurückgewinnen ließ. Eine Hydrolyse des Acetals, ohne Verseifung der Acylgruppe, ist also nicht gelungen.

Benzoyl-pyridoxal-diäthylmercaptopal

100 mg Benzoyl-pyridoxal-acetal wurden in 4 cm³ Aethylmercaptopal gelöst und auf —5° abgekühlt, worauf man während 5 Minuten trockenes Salzsäure-Gas einleitete. Nach ca. einer Minute war ein dicker, gelber Niederschlag ausgefallen, der aber bei weiterem Einleiten von HCl wieder in Lösung ging. Die mit Chlorwasserstoff gesättigte Mercaptopal-Lösung stand hiernach während 24 Stunden bei —10° im Kühlschrank.

Zur Aufarbeitung haben wir das Mercaptopal bei 20° abdestilliert, den Rückstand mit Wasser und Aether überschlachtet und zur Bindung der Salzsäure bis p_{H} 7,5 Natriumhydrogencarbonat zugesetzt und geschüttelt. Nach dreimaligem Ausziehen der schwach alkalischen Lösung mit Aether, Waschen der vereinigten Aether-Auszüge mit Wasser und Trocknen, hat man den Aether abdestilliert, wonach ein hellbraunes Öl zurückblieb. Dieses haben wir am Rückfluß mehrmals mit tiefsiedendem Petroläther ausgekocht und die Petrolätherlösungen gesammelt. Nach mehrstündigem Stehen hatten sich in der Lösung große, farblose Kristalle gebildet, deren Schmelzpunkt vor und nach dem Umkristallisieren bei 116—117° lag. Wie die Analyse zeigt, handelt es sich um das 3-Benzoyl-pyridoxal-diäthylmercaptopal.

$C_{19}H_{23}O_3NS_2$
(377,18)

Berechnet:	C 60,44 %	H 6,13 %
Gefunden:	C 60,36 %	H 5,95 %
Berechnet:	N 3,71 %	S 16,97 %
Gefunden:	N 4,25 %	S 17,44 %

Versuche zur Phosphorylierung des Benzoyl-pyridoxal-diäthylmercaptals

500 mg Benzoyl-pyridoxal-mercaptopal wurden in einem 15 cm³ Kolben in 3 cm³ Pyridin gelöst, die Lösung auf 0° abgekühlt und aus einer Pipette 2 Mol frisch destilliertes POCl₃ eingetropft. Die Mischung hatte sich nach kurzer Zeit gelb gefärbt und stand danach noch 20 Stunden bei Zimmertemperatur, wonach das Reaktionsgemisch braun geworden war.

Zur Aufarbeitung wurde der Kolben auf —12° gekühlt und langsam Wasser in kleinen Tropfen eingetropft. Nachdem so alles Phosphoroxychlorid zersetzt war, hat man weitere 10 cm³ Wasser hinzugefügt, wobei die Lösung völlig klar blieb. (Das Ausgangsmaterial ist wasserunlöslich.) Hierauf trug man in die gekühlte Lösung feinst gepulvertes Bariumhydroxyd so lange ein, bis das p_H 8,5 betrug. Sodann wurde von ausgeschiedenem Bariumphosphat rasch abgenutscht und mit Wasser nachgewaschen. Das Filtrat haben wir sofort mit 0,5-n H₂SO₄ tropfenweise versetzt und die überschüssigen Barium-ionen ausgefällt. — Zur Entfernung der noch in der Lösung vorhandenen Chlorionen hat man mit Silbercarbonat geschüttelt und nach Filtration die geringe in Lösung gegangene Silbermenge durch Schwefelwasserstoff-Fällung beseitigt. So entstand eine klare, hellgelbe Lösung, die jedoch keinen Phosphor enthielt. Nach der Wasserlöslichkeit der Substanz zu schließen, ist zumindest auch die Benzoyl-Gruppe abgespalten worden.

Curriculum vitae

Am 15. Mai 1921 wurde ich als Bürger von Hugelshofen (Thurgau) in Hamburg geboren. Nach Besuch der Vor- und Mittelschule legte ich im Dezember 1939 an der Oberrealschule für Jungen auf der Uhlenhorst das Maturitätsexamen ab. Hiernach rückte ich zur Absolvierung der Rekrutenschule nach St. Gallen ein. Im Wintersemester 1940/41 immatrikulierte ich mich zum Chemiestudium an der Hansischen Universität in Hamburg. Von dort kehrte ich im Frühjahr 1943 nach der Schweiz zurück und studierte zunächst ein Semester an der Universität Basel, um dann im Wintersemester 1943/44 das Studium an der Universität Zürich fortzusetzen. Im Herbst 1945 wurde ich zum Hilfsassistenten und ein Semester später zum wissenschaftlichen Assistenten ernannt. Mit der vorliegenden Arbeit schloß ich den praktischen Teil meines Studiums im Januar 1948 ab. Zum Abschluß des Studiums legte ich die folgenden Prüfungen ab:

Mathematik (Prof. Fueter), Physiologie (Prof. Heß), Physik (Prof. Meyer), Physikalische Chemie (Prof. Clusius), und Chemie (Prof. Karrer).

